

201132033A

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

小児臓器移植前後における  
ワクチン接種の安全性と有効性に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 齋藤 昭彦

平成 24 (2012) 年 3 月

# 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

## I. 総括研究報告

- 小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究…… 2  
研究代表者 齋藤 昭彦

## II. 分担研究報告

1. 小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究……10  
研究分担者 笠原 群生
2. 小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究……12  
研究分担者 竹田 誠

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

……………20

## IV. 研究成果の刊行物・別冊

……………24

# I . 総括研究報告

小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究

研究代表者 齋藤 昭彦 新潟大学大学院医歯学総合研究科小児科学分野 教授

**研究要旨**

生体肝移植は、肝、代謝疾患に罹患し、内科的治療に限界のある小児患者に対する最終的な治療手段である。小児の生体肝移植の適応患者は、多くが乳幼児であり、肝移植後に免疫抑制薬を服用し続けるため、様々な感染症に対して脆弱であり、感染すると重症化し、また、後遺症を残したり、死亡するおそれがある。それらの感染症の中で、特にワクチンで予防できる疾患（VPD: Vaccine Preventable Diseases）に関しては、可能な限りワクチンを接種し、その予防と万が一罹患した場合には、その軽症化に努めることが重要である。国立成育医療研究センターでは平成 17 年 11 月から平成 24 年 3 月までに 180 例を超える生体肝移植を施行してきた。生体ドナーには重篤な合併症を認めず、レシピエント生存率 89%（全国平均生存率 86.6%）と成績良好である。当センターでは、生体肝移植を受けた患者が VPD から守られるように、積極的なワクチン接種を推奨しているが、肝移植前後のワクチンの有効性、安全性を示すデータは少なく、特に小児では、極めて乏しい。本研究の目的は、当センターにおいて、生体肝移植を受けた、あるいは、生体肝移植予定の小児の客観的な免疫学的評価を行い、効果があり、かつ安全なワクチン接種スケジュールの作成を行うことである。平成 22 年度は、過去に当センターで行われた生体肝移植患者約 110 名に行われたワクチン接種について、移植前と移植後に分け、接種されたワクチンの種類、副反応、各疾患に対する罹患歴を後方視的に調査し、当センターにおける生体肝移植患者に対するワクチン接種が安全に行われていることを明らかにした。また、本研究の倫理委員会への申請を行い、その申請許可を得た。平成 23 年度は、移植前後の患者からの検体の採取を開始し、検体を処理し、そして検査を開始した。最終年度である平成 24 年度は、検体の採取を継続しながら、データを蓄積し、そのデータを解析し、接種後の免疫機能を評価、生体肝移植患者における客観的データに基づく予防接種スケジュールを作るための基礎データを作成する。これらの情報は、国内外の学会、専門誌に発表し、最終的に国内外の生体肝移植を行う施設に発信する予定である。一方で、これらの情報は、生体肝移植患者にとどまらず、同様の免疫抑制剤を服用する腎移植患者、化学療法後の患者、更には、今後普及する可能性のある死体患者からの移植後の患者に対しても、重要な情報になるものと考えられる。

**研究分担者**

笠原 群生 国立成育医療センター移植外科  
医長  
竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第 3 部  
部長

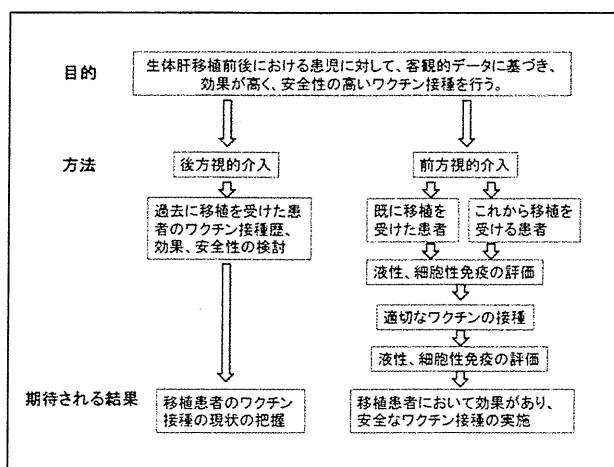
**A. 研究目的**

生体肝移植後の児は、免疫抑制剤を常時服用し、免疫不全状態におかれる。これらの脆弱な子供達を様々な感染症、特にワクチンで予防できる疾患（VPD: Vaccine Preventable Diseases）から守るの

は、我々の責務である。当センターでは、その様な患者に対して、ワクチン接種を強く推奨しているが、生体肝移植後の患者に対して、推奨される予防接種スケジュールは存在しない。当センターでは、1) 不活化ワクチンの接種は肝移植術後1年以上、生ワクチンの接種は2年以上経過、2) 肝機能・全身状態が良好（ワクチン接種予定の6か月以内に拒絶反応、感染症のエピソードがない）、3) 免疫抑制療法が低用量のカルシニューリン阻害剤による単剤投与、以上の条件を満たすものにワクチン接種を実施してきた。しかしながら、その開始時期、適応に関しては、経験的などころが多く、科学的根拠に乏しい。

生体肝移植前のワクチン接種の有効性、安全性を規定する大きな要因は、患者の年齢である。特に水痘、麻疹、ムンプス、風疹などの生ワクチンは生後1歳以降に接種することが推奨されているが、生体肝移植の患者の約半数は、1歳未満の患者であり、その年齢における接種の安全性、有効性は不明である。一方で移植患者に生ワクチンに関する安全性を確認するデータは存在するものの(Vaccine 2008;26:6859-63.)、インフルエンザワクチンに対しては、効果が弱いというデータも存在する(Clin Infect Dis 2008;46:712-8)。これらに大きな影響を与えるのが、患者の年齢、免疫抑制薬の量、種類などである。したがって、より客観的な指標をもって、効果があり、安全なワクチン接種が行えるように、年齢、免疫抑制剤の種類、量などに基づいて、接種後の抗体価の測定、細胞性免疫機能の評価を移植後の患者に行い、データを蓄積することが重要である。それらのデータに基づいて、効果があり、かつ安全性の高いワクチンスケジュールを作成し、それを国内外に提供することがこの研究の目的である。本研究の大きな特徴は、国内で最大の小児生体肝移植症例数を誇る国立成育医療研究センターにおいて、今後、多くの患児の研究への参加が期待でき、より多くのデータの集積が期待できること、また、研究前に既に150名のワクチン接種を受けた生体肝移植患者がおり、それらの患者に対するワクチンの効

果と安全性の調査が行えることである。



## B. 研究方法

### ① 過去に生体肝移植を行った児の移植前後のワクチン接種歴とその効果

平成17年から平成22年夏まで当センターで行われた生体肝移植患者約120名に行われたワクチン接種について、移植前と移植後に分けて接種されたワクチンの種類、接種後の副反応、その後の各疾患に対する罹患歴、ワクチンの効果を後方視的に調査し、その有効性、安全性について検討した。抽出されるデータは、患者の年齢、基礎疾患、ワクチンの種類と接種日、肝移植実施日、各疾患に対する罹患の有無、免疫抑制剤の服用と期間、副反応などである。

### ② 生体肝移植前後のワクチンの効果、安全性の前方視的調査

#### 1) 生体肝移植前の患者の評価

目標症例数は、現時点で当センターで年間約40例の生体肝移植が行われており、3年間で約120例の症例が研究に参加可能である。それらの患者に対して、移植前に接種できるワクチンは、可能な限り接種を推奨する。まず、患者の免疫能の評価として、接種前の各種抗体価と細胞性免疫機能の評価する。また、移植入院時、同様の検査を行い、既に接種したワクチンの効果を抗体価、細胞性免疫機能を用いて評価する。

#### 2) 生体肝移植後の患者の評価

移植後は、移植後1, 3, 6, 9, 12, 18, 24カ月に同様の抗体価、細胞性免疫機能の評価を行う。特定のワクチン接種後は、その特定のウイルス、または



= 0.38)であり、特に麻疹、水痘ワクチンにおいて、その差が統計学的優位差を持って乳児で低いことが明らかとなった。

## ②生体肝移植前後のワクチンの効果、安全性の前方視的調査

生体肝移植は、継続的に行われており、2011年度には、40件を超える肝移植が行われた。一方で、これらの児に予防接種を行う場を確保するために、2010年8月より、国立成育医療研究センターのワクチンセンターにおける活動を開始し、肝移植前後の患者のワクチン接種を開始した。ここでは、現在、週1回の外来を行っており、多くの患者が予防接種の評価と実際の接種を行っている。また、本研究の内容は、2010年10月5日に国立成育医療研究センターの倫理委員会の承認を得た。また、その後、同研究内容が国立感染症研究所の倫理委員会でも承認された。現在、患者検体の採取を外来で行っており、2012年3月現在、計92検体の採取を行い、国立感染症研究所に検体を輸送し、実際の測定が実施されている。液性免疫の評価である抗体価の測定に関しては、阪大微生物研究所にて測定されている。

### 1) 水痘

水痘特異的細胞性免疫の測定には、患者の末梢血単核球 (PBMC) を用い、インターフェロン (IFN)  $\gamma$  産生を指標とした細胞性免疫を ELISPOT 法を用いた。この方法によって、各検体は、その反応により5つのグループに分けられたが、小児患者においては、判定不能となる検体が14%に見られており、その原因の解明が必要である。一方で、それらの検体に関しては、IE62を高度に発現させた細胞より調整した核画分を用いることで、感度の上昇が期待される。

### 麻疹

IFN- $\gamma$  の検出に Real-time PCR 法が有用であることが明らかとなり、その解析を現在進めている。

### 風疹

IFN- $\gamma$  の検出に ELISPOT が有用であることが少数の検体から明らかとなったため、その至的条件の検討を行っている。

## D. 考察

生体肝移植後にどのようなスケジュールでワクチン接種を勧めるかは、免疫の低下した子どもたちをワクチンで予防できる病気から守るためにも、極めて重要な課題である。残念ながら、その基準となるデータは未だ存在せず、それぞれの患者の年齢、基礎疾患、免疫抑制剤の種類、量などによって、その適応が異なる。今回の検討では、液性免疫の評価からは、特に麻疹ワクチン、水痘ワクチンにおいては、1歳未満で接種した場合、その抗体価の上昇は限られていることが分かった。したがって、1歳未満での接種を行った児においては、その後の追加接種の検討が必要である。また、これらの児の細胞性免疫機能の評価の結果が待たれるところである。これらの結果によっては、それぞれの患者の年齢、基礎疾患、免疫抑制剤の量などに応じたテーラーメイドのワクチン接種が可能になると考える。

## E. 結論

生体移植後のワクチン接種は、客観的データがなく、その接種に関する明確な基準は存在しない。したがって、現在検体採取を行っている患者のデータを把握することは極めて重要であり、特に細胞性免疫のデータの蓄積と液性免疫のデータとの関連の解析が待たれる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

国内の学会発表

第43回日本小児感染症学会総会、学術集会 岡

山市 Herd Immunityの重要性 10/28/2011

第43回日本小児感染症学会総会、学術集会 岡山市 教育講演 米国における小児感染領域の研究の実態と課題 10/29/2011

第36回東日本小児科学会 つくば市 日本小児科学会の推奨する予防接種スケジュール-子どもたちをワクチンで予防できる病気から守るために- 11/23/2011

第15回日本ワクチン学会学術集会 東京都 教育講演 アメリカにおける感染症、予防接種の教育と啓発 12/11/2011

国内での講演

11/12/2011 市民公開セミナー 新潟市 こどもの予防接種-その効果と副反応-

11/19/2011 日医生涯教育協力講座 水戸市 日本小児科学会推奨の予防接種スケジュール-今後の日本の予防接種制度を考える-

日医生涯教育協力講座 福井市 日本小児科学会推奨の予防接種スケジュール-今後の日本の予防接種制度を考える- 11/20/2011

日医生涯教育協力講座 千葉市 日本と欧米のワクチンギャップを考える-日本小児科学会推奨の予防接種スケジュールから見えてくる現状と課題- 11/23/2011

日医生涯教育協力講座 盛岡市 日本小児科学会推奨の予防接種スケジュール-今後の日本の予防接種制度を考える- 11/26/2011

新潟県学校保健研修会 長岡市 日本の予防接種制度の現状と課題-日本小児科学会推奨のスケジュールから見えてくるもの- 11/20/2011

SRL 感染症フォーラム 東京都 ワクチンで予防できる病気から子どもたちを守るために - 日本の予防接種制度の転換期を向えて - 12/17/2011

新潟県小児保健研究会 新潟市 日本の予防接種制度について考える-日本小児科学会推奨の予防接種スケジュールから見えてくる現状と課題- 9/16/2011

国内の雑誌での発表

基礎疾患をもつ小児における予防接種の同時接種 日本小児科学会雑誌（受理中）

Peer-Reviewed Journals に掲載された記事

**Saitoh A**, Sakamoto S, Fukuda A, Shigeta T, Kakiuchi T, Kamiyama S, Katsuta T, Shoji K, Ogimi C, Kasahara M. Universal Preemptive Therapy for Cytomegalovirus Infections in Children after Live-Donor Liver Transplantation. *Transplantation* 2011 27;92:930-5.

Hanaoka M, **Saitoh A**, Kubo T. Discrepancy between human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) screening test and confirmatory tests in non-endemic areas. *J Obstetrics and Gynaecology Research* 2012;38:793-6.

**Saitoh A**, Nagai A, Tenjinbaru K, Li P, Vaughn DW, Roman F, Kato T. Persistence of immunological response six months after vaccination with an AS03-adjuvanted H1N1 2009 influenza vaccine: an open-label, randomised trial in Japanese children aged 6 months to 17 years. *Hum Vaccin & Immunother* (accepted).

Shoji K, Komuro H, Kobayashi Y, Shike T, Funaki



T, Katsuta T, Miyata I, **Saitoh A**. An Infant with Human Parechovirus Type 3 Infection with a Distinctive Rash on the Extremities. *Pediatr Dermatol* (accepted).

**Saitoh A**, Okabe N. Current Issues with the Immunization Program in Japan: Can we Fill the "Vaccine Gap"? *Vaccine* (accepted).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## II. 分担研究報告

分担研究報告書

小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究

研究分担者 笠原群生 所属 国立成育医療研究センター

研究要旨

小児肝移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性

A. 研究目的

固形臓器移植後の免疫不全状態においては種々の感染症に罹患する頻度が高い。移植後は移植前に自然感染もしくは予防接種によって得られた免疫能が経年的に低下するために予防接種によって発症の予防もしくは症状の軽減が期待できる場合はその実施が推奨される。健常者への予防接種と異なり、副反応に対する注意が必要であるがその実施に際しては個々の症例に応じて対応する必要がある。現在確立されていない固形臓器移植後のワクチン接種の安全性を確立する。

B. 研究方法

肝移植後半年経過した症例に対し、計画的にワクチン接種を実施し、抗体獲得能を評価した。

（倫理面への配慮）

当該治療の成果は、学会報告や学術雑誌、データベース上で公表されることがあるが、匿名化を行うなど、個人情報を保護する。

C. 研究結果

2005年11月～2012年3月末までに191例の肝移植を実施した。肝移植後患者で免疫抑制剤投与中の患者に、計画的にワクチン接種を実施した。重篤な副作用を認めず、免疫抑制状態であっても、安全にワクチン接種が可能であった。

D. 考察

肝移植成績は92%と良好であった。乳児期に肝移植を受ける患者では、術前肝不全のためにワクチン接種が不可能なことがあり、術後に麻疹

・風疹・水痘感染症が固形臓器移植後に重篤化することがある。今回安全にワクチン接種が可能であることが証明されたが、今後個々の患者の免疫抑制剤使用状況・細胞分画を検討し、免疫能に応じたワクチン接種プロトコルを検討し、固形臓器移植後の感染症罹患の危険性を低下させ、移植成績の更なる向上を考慮すべきである。

E. 結論

免疫抑制状態であっても、安全にワクチン接種が可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

<英語論文>

1. Kasahara M, Sakamoto S, Kanazawa H, Karaki C, Kakiuchi T, Shigeta T, Fukuda A, Kosaki R, Nakazawa A, Ishige M, Nagao M, Shigematsu Y, Yorifuji T, Naiki Y, Horikawa R: Living-donor liver transplantation for propionic acidemia. *Pediatr Transplant*. 2011 Dec 7.
2. Sakamoto S, Kasahara M, Shigeta T, Fukuda A, Kakiuchi T, Miyasaka M, Nosaka S, Nakano N, Nakagawa A, Horikawa R: Living Donor Liver Transplantation for Multiple Intrahepatic Portosystemic Shunts Following Involution of Infantile Hepatic Hemangiomas *Journal of Pediatric Surgery*. *Journal of Pediatric Surgery* 2011 Jun;46(6):1288-91
3. Fukuda A, Sakamoto S, Shigeta T, Kakiuchi T, Matsuno N, Tanaka H, Kitamura M, Nosaka S, Nakazawa A, Kasahara M: Hepatobiliary

scintigraphy for the assessment of biliary stricture after pediatric living donor liver transplantation for hepaticojejunostomy reconstruction: the value of the excretion rate at 60 min. *Pediatr Transplant*. 2011 Sep; 15(6):594-600.

<日本語論文>

1. 笠原群生, 今留兼一, 阪本靖介, 金澤寛之, 重田孝信, 福田晃也, 垣内俊彦, 唐木千晶, 中澤温子: EBウイルス感染症モニタリングによる肝移植後の至適免疫抑制療法. *今日の移植* 2011; 24(6), 577-580
2. 笠原群生, 阪本靖介, 重田孝信, 田中秀明, 垣内俊彦, 福田晃也: 先天性門脈欠損症に対して左腎静脈門脈吻合を施行した生体肝移植手術. *手術* 2011; 65(5), 607-611
3. 笠原群生, 堀川玲子: 肝移植による代謝疾患の治療. *小児科*, 2011; 52(121), 763-1770
4. 笠原群生, 阪本靖介, 垣内俊彦, 福田晃也, 重田孝信, 中澤温子, 松井陽: 胆汁うっ滞症に対する肝移植の問題点. *小児内科* 2011; 43(6), 1077-1081
5. 田中久子, 瀧本哲也, 阪本靖介, 福田晃也, 垣内俊彦, 重田孝信, 中澤温子, 笠原群生: 国立成育医療研究センターにおける小児生体肝移

植の実態(第1報)—小児肝移植のデータベース構築に向けて—. *移植* 2011; 46(4/5), 325-334

2. 学会発表

1. 笠原群生: Novartis CCPF Research Grant 2010 受賞講演 EBウイルス感染症モニタリングによる肝移植後の至適免疫抑制療法に関する研究. *Ciclosporin Pharmac Clinical Forum* 2011, 名古屋, 2011/7/30
2. 笠原群生: 国際シンポジウム6 ここまで到達した小児の臓器移植—外科医からのメッセージ—ここまで到達した小児の肝移植. 第114回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011/8/14
3. 笠原群生: ランチョンセミナー「小児肝移植のトピックス」. 第38回日本小児栄養消化器肝臓学会, 盛岡, 2011/10/9

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

分担研究報告書

小児臓器移植前後におけるワクチン接種の安全性と有効性に関する研究

研究分担者 竹田 誠 (国立感染症研究所ウイルス第三部)

研究要旨

生体肝移植後の患者に対しては、推奨されるワクチンスケジュールが存在しない。本分担研究の目的は、特に水痘、麻疹、風疹について、より客観的な指標をもって、効果があり、安全なワクチン接種が行えるように、細胞性免疫機能の評価を移植前後の患者に行い、データを蓄積することである。水痘、麻疹、風疹の各々に関して細胞性免疫機能の評価のための ELISPOT 法やヒト IFN- $\gamma$  mRNA の定量に向けての条件検討や解析を行った。水痘に関しては、計 93 検体の移植前後の小児の細胞性免疫能を ELISPOT 法により測定し、核画分を用いることで、特異性を向上できることを明らかにした。また、IE62 が主要な細胞性免疫の標的であり、単独で高度発現させた細胞を用いても一定の感度があることを示した。麻疹に関しては、IFN- $\gamma$  産生細胞の検出にリアルタイム PCR 法が有用であることを示した。ワクチン接種後の経過時間が短い健常人リンパ球を得ることができたので、今後は最適な試験条件を検討し、研究対象者検体の測定を進めて行く。風疹に関しては、ELISPOT assay 法の至適条件の検討を行い、MR ワクチン接種移植児の臨床検体 PBMC を用いた検討を行う準備を整えた。

研究協力者

井上直樹 国立感染症研究所ウイルス第一部  
金井亨輔 国立感染症研究所ウイルス第一部  
染谷健二 国立感染症研究所ウイルス第三部  
岡本貴世子 国立感染症研究所ウイルス第三部

いて細胞性免疫機能の評価を移植前後の患者に行い、データを蓄積することが本分担研究の目的である。

B. 研究方法

【水痘に関して】

1. 臓器移植患者検体における VZV 特異的細胞性免疫能の定量

昨年度、VZV 特異的細胞性免疫の定量系を整備するため、(独)医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・森康子先生より ELISPOT 法の技術移転を受けた。本研究室で方法の至適化を行い、以下の条件で定量を行った。

1) 抗原の調製: モルモット線維芽細胞 GPL に水痘ワクチン株 V-Oka を MOI 0.01 程度で感染後 7 日目に細胞を回収した。細胞を PBS で洗浄後、T75 フラスコ当り 10 ml の PBS に懸濁し超音波破碎後、4°C で 600xg、10 分間遠心した上清を ELISPOT 用の抗原とした。また、未感染細胞から同様にして得た抽出液を陰性対照とし

A. 研究目的

生体肝移植後の児は、免疫抑制剤を常時服用し免疫不全状態におかれる。これらの脆弱な子供達を様々な感染症、特にワクチンで予防できる疾患から守るのは、われわれの責務である。しかしながら、移植後の患者に対しては、推奨されるワクチンスケジュールが存在しない。特に水痘、麻疹、風疹などの生ワクチンは生後 1 歳以降に接種することが推奨されているが、生体肝移植の患者の約半数は、1 歳未満の患者であり、その年齢における接種の安全性、有効性は不明である。したがって、より客観的な指標をもって、効果があり、安全なワクチン接種が行えるように、特に水痘、麻疹、風疹につ

た。

2) ELISPOT 反応:疎水性 PVDF フィルターのプレート (IP) に 200ng/50  $\mu$ l/well で抗ヒトインターフェロン (IFN)- $\gamma$  抗体 (Thermo Scientific) を加えて 4°C で一晩コーティングした。成育医療センターより届けられたセルバンカーに懸濁された 1 バイアル当たり約  $10^6$  個の末梢血単核球 (PBMC) に、37°C に加温した 5%FBS/RPMI1640 を加えて解凍し、抗体をコートしたプレートに 1well 当たり 1 ないし  $2 \times 10^5$  個の細胞を加え、さらに抗原を 1.6  $\mu$ g ずつ加えて 36~40 時間培養した。培養液を除き、PBS にて 4 回洗浄後、ビオチン標識ヒト IFN- $\gamma$  抗体 (Thermo Scientific) を 40ng/100  $\mu$ l/well 加え、常温にて 1 時間反応後、再度 PBS にて 4 回洗浄した。1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを 100  $\mu$ l 加え、常温にて 45 分間反応後、PBS にて 4 回洗浄し、TMB (Moss. Inc.) により発色させた。陽性対照として、PHA 0.4  $\mu$ g を添加した well を用意した。毎回の試験の成立を確認するために、健常ボランティアの同一検体を用いた。

3) スポット数の計測:健常ボランティアのスポットが期待される範囲であることを確認した後、実体顕微鏡下で計数した。結果は、表 1 に示した基準により分類した。

## 2. 遺伝子導入細胞からの核及び細胞質画分の調製

1) 遺伝子導入法:6 穴プレートにまいた 293 T 細胞に、リン酸カルシウム法を用いて 4  $\mu$ g の発現ベクター DNA を導入した。2 日間培養後、細胞を 0.05% Trypsin で剥がして回収した。

2) 分画:細胞沈殿を PBS(-) で洗浄後、氷冷した Hypotonic Buffer (10mM HEPES, pH7.9, 1.5mM MgCL<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0.5mM DTT, Protease inhibitor) に懸濁し、氷冷した 1ml Dounce homogenizer と Tight pestle で細胞を破碎した。細胞破碎液を 230xg, 5 分間 4°C で遠心して得られた沈殿 (=核画分) に 1ml の氷冷した PBS(-) を加えて氷水中で Bioruptor により超音波処理 (30 秒 3 回) を行い、核ライセートを得た。

## 3. ヒト IFN- $\gamma$ mRNA の定量

IFN- $\gamma$  mRNA 検出のためのプライマー、プローブは、Taqman gene expression assay kit (Hs00989291\_m1, Applied Biosystems) として購入し、One-step RT-PCR Master Mix reagent (Applied Biosystems) を用いて ABI7700 で定量を行った。PCR 反応の温度は、1  $\times$  [48°C 30 分], 1  $\times$  [95°C 10 分], 40  $\times$  [95°C 15 秒, 60°C 1 分] で行った。IFN- $\gamma$  発現のスタンダードとして、V-Oka 感染ヒト二倍体細胞の Total RNA を段階希釈したものを用いた。RNA 発現内部標準として G6PD のプライマープローブセットを用い、得られた結果は Ct 法により数値化した。

### 【麻疹に関して】

抗原特異的細胞性免疫応答の解析には、免疫細胞増殖反応の測定、細胞障害活性の測定、サイトカイン産生細胞の検出など、様々な方法が開発されている。昨年度の本研究では、ELISPOT 法による麻疹ウイルス特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞の検出を検討し、本法が細胞性免疫応答の測定に有効であることを確認した。今年度は、より高感度な方法であるリアルタイム PCR 法による細胞性免疫応答の解析を試みた。

麻疹ワクチン接種歴のある健常人より分離したリンパ球  $2 \times 10^5$  個に麻疹ウイルス Edmonston 株を M.O.I=0.5、またはウイルス感染細胞溶解液 (Virus lysate) を加えて 48 時間培養した。陰性コントロール (N.control) には、ウイルス未接種のリンパ球、陽性コントロールにはマイトジェン (PHA: phytohemagglutinin) 刺激したリンパ球を用いた。培養後、細胞から RNA を抽出し、内在性コントロール遺伝子 ( $\beta$ -アクチン) と IFN- $\gamma$  遺伝子の相対定量測定 (比較 C<sub>T</sub> 法:  $\Delta \Delta C_T$  法) を行った。

### 【風疹に関して】

風疹ウイルス特異的細胞性免疫の評価系として用いる ELISPOT 法の条件検討を行った。

#### 1) ウイルス抗原量の検討

不活化精製ウイルスを抗原とし、MR ワクチン接種後 2 年を経過した健常ヒト末梢血単核球 (PBMC) を用いて T cell proliferation assay により、T 細胞活性化に必要な抗

原量を推定した。

## 2) 末梢血単核球(PBMC)数の検討

MRワクチン接種前と接種 20 日後の健康人ボランティアの PBMC を試料とし、不活化精製ウイルスを抗原として市販の human IFN- $\gamma$  ELISPOT kit (BD #551849)を用いて至適 PBMC 数の検討を行った。

### 倫理面への配慮

本研究は材料として健康人ボランティアから得たヒト末梢血を使用した。成育医療センター研究所倫理委員会及び国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査会において承認された内容に則り、採血の際に十分な説明を行った上で同意を得た。また、検体から個人が特定できないように検体を管理することで、個人情報の保護に配慮して研究が実施された。

## C. 研究結果

### 【水痘に関して】

1. 臓器移植患児の VZV 特異的細胞性免疫能の解析  
水痘ワクチン接種前後の臓器移植患者末梢血から分離した末梢血単核球(PBMC)検体における VZV 特異的細胞性免疫の定量を行った。平成 24 年 3 月末までに生体肝移植患者検体 92 検体及び腎移植患者検体 11 検体が成育医療センターより送付された。今回得られたデータを分類すると、「明らかな細胞性免疫反応が認められる」検体が肝移植患者で 15 検体、腎移植患者で 6 検体であった。「VZV 特異的細胞性免疫反応が認められるが反応が弱い、または非特異的な反応が見られる」検体が肝移植患者で 10 検体及び腎移植患者で 3 検体、「VZV 特異的細胞性免疫反応が認められない」検体が肝移植患者で 35 検体、「細胞性免疫が認められない」検体が肝移植患者で 19 検体、「判定不能」の検体が肝移植患者で 13 検体及び腎移植患者で 2 検体であった。

## 2. 細胞性免疫測定系の感度向上のための検討

現在用いている ELISPOT 法は手法が煩雑で検出まで

に最低 5 日要する。より簡便・迅速な VZV 特異的細胞性免疫能の定量法の樹立及び特異性・感度の向上を目指し、以下の検討を行った。

### 1) リアルタイム PCR 法を用いた IFN- $\gamma$ mRNA 発現定量系

IFN- $\gamma$  mRNA 発現を定量することにより細胞性免疫能をより感度よく定量できないか検討した。健康人 PBMC を、未処理もしくは PHA 存在下で 36~40 時間培養して得た Total RNA を用いて IFN- $\gamma$  mRNA を定量した。しかしながら、mRNA 発現量の差は 4 倍程度であり、ワクチン接種に伴う VZV 特異的免疫応答を検出するには不十分であると判断された。

### 2) 感染細胞の核画分を用いた特異性及び感度の向上

昨年度、ELISPOT 法において従来用いられてきた VZV 感染ヒト 2 倍体細胞ライセート(バルク抗原)に代わり、GPL 細胞のバルク抗原を用いても同等の抗原性が得られ、非特異的反応も低減できることを明らかにした。本年度、VZV 感染 GPL 細胞を核と細胞質画分に分け、反応性を検討したところ、未感染 GPL 細胞核画分では非特異反応がさらに低減し、VZV 感染 GPL 細胞核画分は、バルク抗原と同程度の抗原性が得られることが明らかとなった(図 1)。

### 3) VZV の特定遺伝子を発現させた細胞から調製した抗原を用いた特異性・感度の向上

VZV 粒子中の糖蛋白 E(gE) 及び核抗原 IE62 は強い CTL 応答を引き起こすことが知られている。そこで、これらの遺伝子を細胞に導入し、高度に発現させた細胞より抗原を調製し、ELISPOT に用いることを試みた。その結果、GPL 細胞は遺伝子導入効率が低いため、十分な抗原性が確保できなかった。一方、293T 細胞は高効率な発現が得られるが、ベクターのみを導入した細胞のライセートを用いた場合にも非特異的なスポットが見られた。そこで、感染細胞と同様に IE62 導入 293T 細胞について核画分を調製し、抗原として用いることで非特異反応を低下させることができることを示した(図 2)。

### 【麻疹に関して】

結果を図3に示す。陰性コントロールと比較して、PHAでは高いIFN- $\gamma$ 遺伝子の発現が認められたが、ウイルス抗原刺激したリンパ球では逆に発現量が減少していた。

#### 【風疹に関して】

MRワクチン接種後2年を経過したHLA-A24/A2の健常ヒト末梢血単核球(PBMC)を用いたT cell proliferation assayでは、不活化精製ウイルス量(タンパク量)0.1 $\mu$ g/wellでstimulation index(抗原刺激有りcpm/抗原刺激なしcpm)は5.0、1 $\mu$ g/wellで11.0とT細胞の増殖が見られた。検討に用いたPBMCはMRワクチン接種後2年を経過していたにも関わらず、抗原量に依存してstimulation indexの増加が見られた。既報の知見を考え合わせてウイルス抗原量は1 $\mu$ g/wellが適していると考えた。ワクチン接種前後のPBMCを用いたIFN- $\gamma$  ELISPOT assayでは、 $1-2 \times 10^5$  cells/wellの条件下で良好な結果が得られた。

#### D. 考察

##### 【水痘に関して】

VZV特異的細胞性免疫能の解析に用いた基準は、医薬基盤研究所感染制御プロジェクトで成人に対して用いられているものと同じであるが、本研究では、予想外に判定不能となる検体が多かった。感染研のボランティアから得られた検体でも、こうした判定不能となるような検体はなく、今回対象としている小児の年齢、基礎疾患及び移植に伴う免疫抑制の効果などから、こうした非特異的反応が発生している可能性がある。VZV感染の既往の有無(特異的抗体で判断)、年齢などで対象を分類して解析することで小児におけるVZV特異的細胞性免疫能の基準を明確にしていくことができると考えられる。また、非特異的反応のために判定不能となった検体については、感染細胞もしくはIE62発現細胞の核画分を用いて、半定量的な解析をすることを考えている。

今回、IE62を高度に発現させた細胞より調製した核画分を用いることで、アッセイの特異性が向上し、結果とし

て、陽性判定に用いるカットオフを下げるができることが明らかになったことから、感度の向上につながることで期待される。IE62以外に核に発現する蛋白を系統的に検討することで、細胞性免疫の主要な標的蛋白を明らかにするとともに、その蛋白からCTLエピトープを同定し、最終的にテトラマー法を構築したいと考えている。テトラマー法はELISPOTに比して、作業量が少ないことや、多数の検体を同時に測定できるなどの利点がある。

##### 【麻疹に関して】

今回の試験では、麻疹ウイルス抗原刺激によるIFN- $\gamma$ 遺伝子発現を検出できなかった。本研究に用いたリンパ球は、ワクチン接種後数十年を経過した健常者から分離されたものを用いているため、ウイルス抗原に対するメモリー反応が減弱していること、さらには、刺激抗原、刺激時間、細胞数等の条件が不適切であることが考えられた。今後は、ワクチン接種後の経過時間が短い健常人リンパ球を用い、試験の最適条件を検討する必要がある。

##### 【風疹に関して】

細胞性免疫誘導の解析のために、今回は市販の不活化精製ウイルスを抗原としてELISPOT assayの検討を行った。その結果、以下の条件で風疹ウイルス特異的T細胞を定量可能であると考えられた。

使用キット:BD human IFN- $\gamma$  ELISPOT kit (BD #551849)

抗原:不活化精製風疹ウイルス 1 $\mu$ g/well

末梢血単核球数: $1 \sim 2 \times 10^5$ /well

今回の条件検討は各1検体により行った結果であるため、さらに陽性検体数を追加して確認を行い、臨床検体PBMCを測定する予定である。

#### E. 結論

##### 【水痘に関して】

1) 計 93 検体の移植前後の小児の細胞性免疫能をELISPOT法により測定した。

2) 核画分を用いることで、特異性を向上できることを明らかにした。



3) IE62 が主要な細胞性免疫の標的であり、単独で高度発現させた細胞を用いても一定の感度があることが示された。

【麻疹に関して】

リアルタイムPCR法は、RNA抽出の煩わしさやコンタミネーションなどの問題もあるが、ELISPOT法にくらべより高感度で特異性が高いことが知られている。今回の試験では、ウイルス抗原刺激細胞からのIFN- $\gamma$ 遺伝子発現を確認できなかったが、陽性コントロール細胞からは高い発現を確認できた。このことから、IFN- $\gamma$ 産生細胞の検出にリアルタイムPCR法が有用であることが示せたと考えられる。ワクチン接種後の経過時間が短い健常人リンパ球を得ることができたので、今後は最適な試験条件を検討し、研究対象者検体の測定を進めて行く予定である。

【風疹に関して】

風疹ウイルスに対する細胞性免疫解析法確立のため、

ELISPOT assay法の至適条件の検討を行い、MRワクチン接種移植児の臨床検体PBMCを用いた検討を行う準備を整えた。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. ELISPOT で得られた結果の分類基準

判定		判定要件
<b>A:</b>	明らかなVZV特異的細胞性免疫反応あり	・PHA抗原添加で40個以上 ・VZV抗原添加で5個以上かつ++以上 ・陰性抗原添加で5個未満かつ2倍以上の差あり
<b>B:</b>	VZV特異的細胞性免疫反応が認められるが反応が弱い、または非特異的な反応が見られる	・PHA抗原添加で40個以上 ・VZV抗原添加で5個以上かつ+以上 ・陰性抗原添加で5個未満または1.2倍以上の差あり
<b>C:</b>	VZV特異的細胞性免疫反応が認められない	・PHA抗原添加で40個以上 ・VZV抗原添加で5個未満または+以下 ・陰性抗原添加で5個未満または差が1.2倍以下
<b>D:</b>	細胞性免疫反応が認められない	・PHA抗原添加で40個未満
<b>E:</b>	判定不能	・上記のいずれにも分類されないもの

図1. 感染細胞核分画を抗原とした場合の特異性・感度

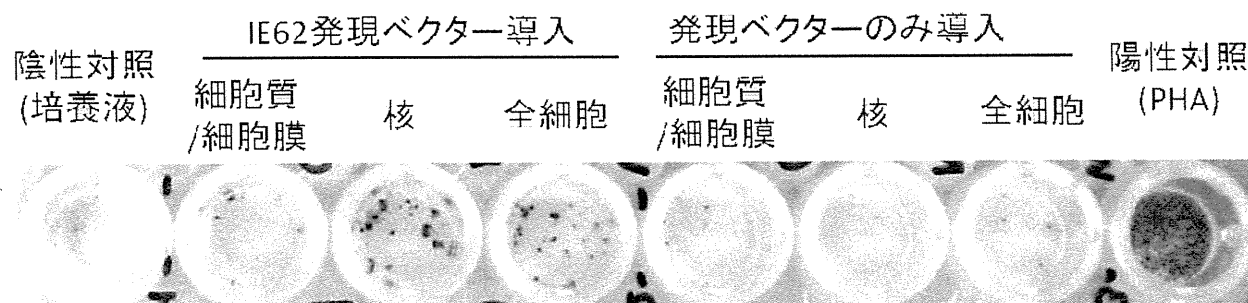
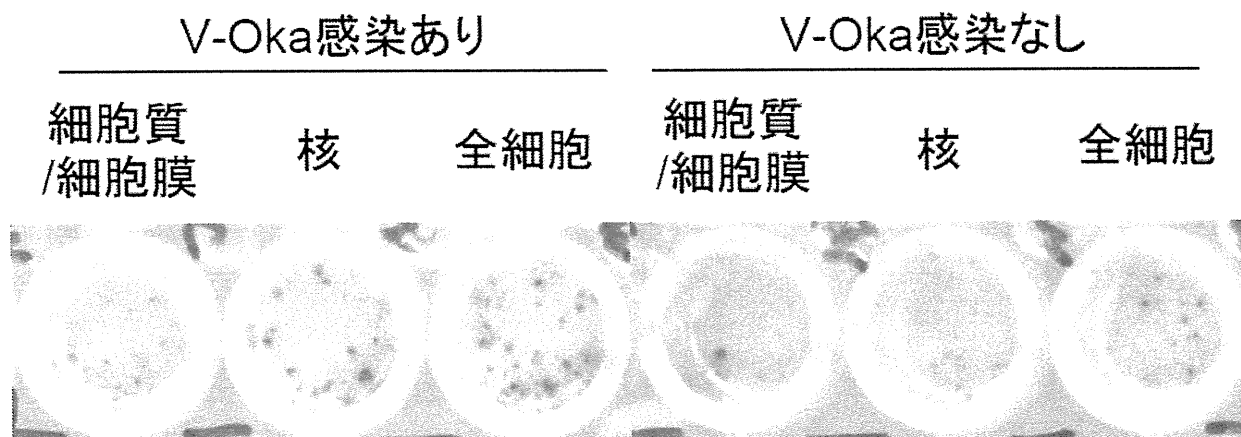
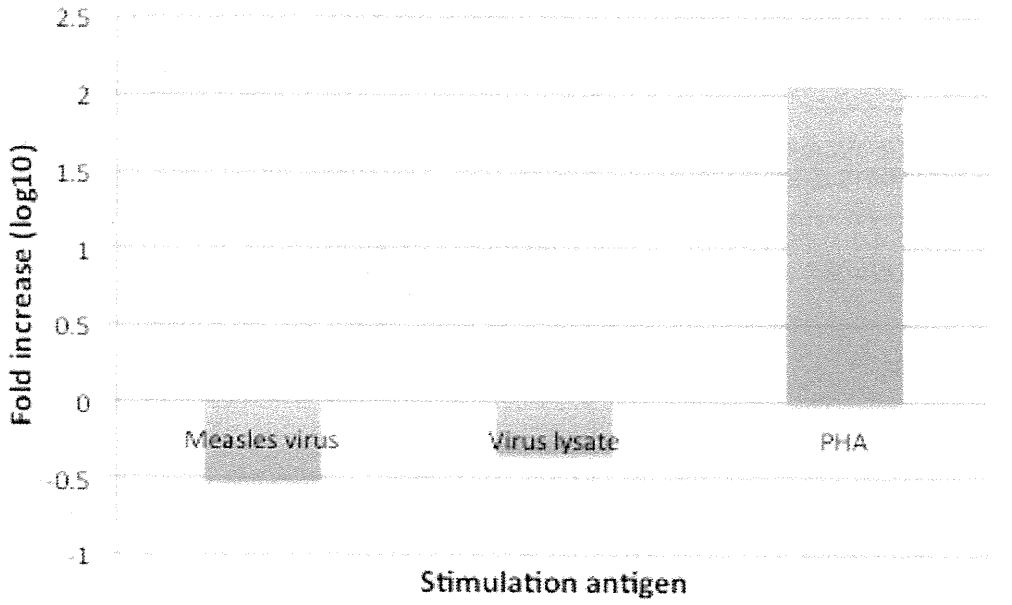


図2. VZVIE62 発現細胞から調製した抗原を用いた場合の特異性・感度

図3. 麻しんウイルス抗原で刺激したリンパ球の IFN- $\gamma$  遺伝子発現量

### IFN- $\gamma$ expression level in human PBMC



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表